

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

血压 (1998.03) 5巻3号:298～303.

【分子高血圧学 最新の進歩】

HMG-CoA還元酵素阻害薬lovastatinのアンジオテンシンII刺激による心
肥大形成に対する抑制効果

—新生児ラット培養心筋細胞における検討—

大井伸治、羽根田俊、大崎純三、柏木雄介、宮田節也、川
辺淳一、中村泰浩、福沢 純、野村智昭、菊池健次郎

特集

分子高血圧学
—最新の進歩—

HMG-CoA 還元酵素阻害薬 lovastatin のアンジオテンシン II 刺激による心肥大形成に対する抑制 効果

—新生児ラット培養心筋細胞における検討—

大井伸治* 羽根田俊* 大崎純三* 柏木雄介*
宮田節也* 川辺淳一* 中村泰浩* 福沢 純*
野村智昭* 菊池健次郎*

* SHINJI Oi, TAKASHI Haneda, JUNZO Osaki, YUSUKE Kashiwagi, SETSUYA Miyata, JUNICHI Kawabe, YASUHIRO Nakamura, JUN Fukuzawa, TOMOAKI Nomura, KENJIRO Kikuchi/旭川医科大学第1内科

われわれは、アンジオテンシン (A) II 刺激による心肥大形成が PKC/MAP キナーゼ系に加え Ras/MAP キナーゼ系を介するか否か、もしこの系を介するならば HMG-CoA 還元酵素阻害薬 lovastatin により、この系が抑制されるか否かを新生児ラット培養心筋細胞を用いて検討した。心筋培養において、AII 刺激は蛋白合成速度を亢進させ、RNA/DNA 比、蛋白/DNA 比を増加させた。Lovastatin の前処置は、AII 刺激によるこれらの増加を部分的に抑制し、これらの抑制効果は mevalonate を同時に前処理すると消失した。Lovastatin または calphostin C の単独投与では、AII 刺激による MAP キナーゼ活性の亢進をそれぞれ部分的に抑制し、両者の併用は完全に抑制した。AII 刺激は Ras 蛋白質活性を亢進させ、lovastatin はこの亢進を抑制した。以上より、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 lovastatin は Ras/MAP キナーゼ系を介して AII 刺激時の心肥大形成を部分的に抑制すること、さらにこの AII 刺激時の心肥大形成には PKC/MAP キナーゼ系に加え Ras/MAP キナーゼ系が協調して関与していることが明示された。

●はじめに

心肥大は圧負荷などの機械的因子や神経・体液性因子などにより形成されるが、心筋虚血や心機能の低下を引き起こす。体液性因子のひとつであるアンジオテンシン (A) II は、心筋細胞においてアンジオテンシンタイプ I (AT₁) 受容体刺激により、プロテインキナーゼ C (PKC) を介して mitogen-activated protein (MAP) キナーゼを活性化し、蛋白合成亢進を惹起する¹⁾。最近、MAP

キナーゼの活性化には PKC を介する系のほかに PKC 非依存性の系も関与することが報告されている。また、種々の細胞において細胞外刺激により低分子量 G 蛋白質 p21^{ras} (Ras) を介して MAP キナーゼ系を活性化することが報告されているが²⁾³⁾、心筋細胞における AII 刺激において、PKC/MAP キナーゼ系に加えて、Ras/MAP キナーゼ系がどのように関与するのかは知られていない。一方、高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害薬は mevalonate の細胞内合成を抑制し、

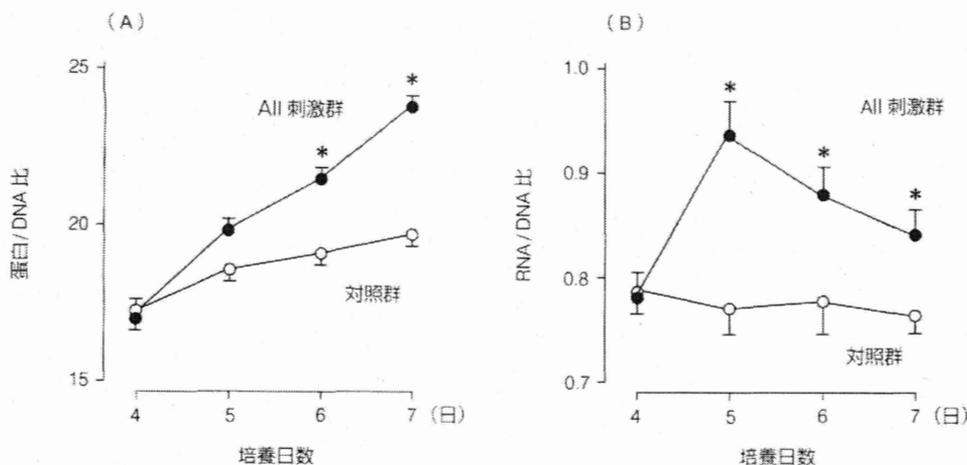


図 1. AII刺激のRNA含量および蛋白含量に対する効果
 数値は8dishの平均±標準誤差。*p<0.05 v. s. 対照群。

表 1. AII刺激によるRNA含量、蛋白含量の増加および蛋白合成速度亢進に対するlovastatinの効果

A II	Lovastatin	Mevalonate	蛋白/DNA比	RNA/DNA比	蛋白合成速度 dpm/ μ g protein
			20.3 \pm 0.3	0.74 \pm 0.02	69.3 \pm 0.7
10 ⁻⁶ mol/l			24.7 \pm 0.4*	0.94 \pm 0.02*	80.8 \pm 0.8*
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁷ mol/l		23.6 \pm 0.3*†	0.88 \pm 0.01*†	78.1 \pm 0.5*†
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l		22.6 \pm 0.3*†	0.85 \pm 0.02*†	76.0 \pm 0.8*†
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁴ mol/l	24.8 \pm 0.4*‡	0.94 \pm 0.01*‡	81.0 \pm 0.6*‡
	10 ⁻⁶ mol/l		20.1 \pm 0.4	0.72 \pm 0.02	69.2 \pm 0.6
		10 ⁻⁶ mol/l	20.4 \pm 0.4	0.75 \pm 0.01	69.7 \pm 0.8

数値は8dishの平均±標準誤差。*p<0.05 vs. 対照群, †p<0.05 vs. AII刺激群, ‡p<0.05 vs. lovastatin前処置AII刺激群。

Ras 蛋白の farnesylation を抑制し、細胞機能に影響を与える可能性がある。そこで、本研究では AII 刺激による心肥大形成に対する HMG-CoA 還元酵素阻害薬 lovastatin の効果を明らかにするために、新生児ラット培養心筋細胞において AII および lovastatin の RNA 含量、蛋白含量、蛋白合成速度、MAP キナーゼ活性および Ras 蛋白質に及ぼす効果について詳細に検討した。

1 方法

1) 実験動物と心筋細胞培養

生後 1~2 日目の Sprague-Dawley ラットから心室筋を細切し、さらに酵素処理により分離分散し心筋細胞を回収した。心筋細胞は直径 60 mm のシャーレに 10⁶ 個になるように細胞数を調整し、10% 仔牛血清を含む MEM 培地にて一晚培養し、その後無血清培養した。培養 4 日目に AII

表 2. AII刺激による RNA 含量, 蛋白含量の増加および蛋白合成速度亢進に対する calphostin C および lovastatin の効果

AII	Lovastatin	Calphostin C	蛋白/DNA 比	RNA/DNA 比	蛋白合成速度 dpm/ μ g protein
			20.2 \pm 0.3	0.73 \pm 0.02	69.3 \pm 0.6
10 ⁻⁶ mol/l			24.5 \pm 0.3*	0.95 \pm 0.02*	81.1 \pm 0.7*
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l		22.9 \pm 0.3*†	0.87 \pm 0.02*†	76.5 \pm 0.6*†
10 ⁻⁶ mol/l		10 ⁻⁶ mol/l	21.5 \pm 0.3*†	0.80 \pm 0.02*†	72.1 \pm 0.5*†
10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l	10 ⁻⁶ mol/l	20.1 \pm 0.4†§	0.75 \pm 0.02†§	69.8 \pm 0.5†§
	10 ⁻⁶ mol/l		20.2 \pm 0.3	0.73 \pm 0.03	69.1 \pm 0.5
		10 ⁻⁶ mol/l	20.0 \pm 0.4	0.72 \pm 0.01	68.9 \pm 0.4

数値は 8dish の平均 \pm 標準誤差。*p<0.05 vs. 対照群, †p<0.05 vs. AII 刺激群, ‡p<0.05 vs. lovastatin 前処置 AII 刺激群, §p<0.05 vs. calphostin C 前処置 AII 刺激群

(10⁻⁶M) を培養液中に添加した。さらに, AII 投与 24 時間前に lovastatin (10⁻⁶M), HMG-CoA 還元酵素反応産物 mevalonate を, AII 投与 30 分前に選択的 PKC 阻害薬 calphostin C (10⁻⁶M) を前処置し, 同様の実験をおこなった。

2) 心筋蛋白, RNA および DNA 含量の測定

培養 4~7 日目に 1 ml のクエン酸ナトリウム緩衝液で心筋細胞を回収し, 心筋蛋白含量を Lowry らの方法⁶⁾で, RNA 含量を Munro と Fleck の方法⁷⁾で, DNA 含量を Cesarone らの方法⁸⁾でそれぞれ測定した。

3) 心筋蛋白合成速度の測定

培養 6 日目に心筋細胞を ¹⁴C-Phenylalanine (1 μ Ci/ml) にて 2 時間標識後に氷上にて 10% トリクロロ酢酸で 1 時間処理し, 1 N NaOH で溶解した。同一検体で放射活性と蛋白量を測定し, 蛋白合成速度を dpm/ μ g protein で表示した。

4) MAP キナーゼ活性の測定

培養 4 日目に AII 刺激後 0 分と 8 分の時点で心筋細胞を超音波破碎し, p42/p44 MAP キナーゼに対する特異的基質への [γ -³²P] ATP のとり

込みを Amersham MAP assay system にて測定した。

5) Ras 蛋白質活性の測定

培養 4 日目に [³²P] orthophosphate (0.1 mCi/ml) にて 8 時間標識後に AII を添加した。AII 刺激後 10 分の時点で心筋細胞を超音波破碎し, Ras 蛋白質を可溶化したのち, 抗 Ras 抗体を用いて免疫沈降した。沈降物は薄層クロマトグラフィで分離し, その後 GTP 結合型 Ras 蛋白質と GDP 結合型 Ras 蛋白質を測定し, Ras 蛋白質活性を GTP 結合型 Ras 蛋白質/GDP 結合型 Ras 蛋白質+GTP 結合型 Ras 蛋白質の比であらわした。

6) 統計学的解析

数値は平均値 \pm 標準誤差で表わし, 有意差検定には unpaired t-test または分散分析を用い, p<0.05 をもって有意とした。

2 結果

1) AII および lovastatin の RNA 含量および蛋白含量に及ぼす効果

培養 4 日目に AII 刺激を加えると, 対照群に比し, 蛋白/DNA 比は培養 6 日目より 14~23%,

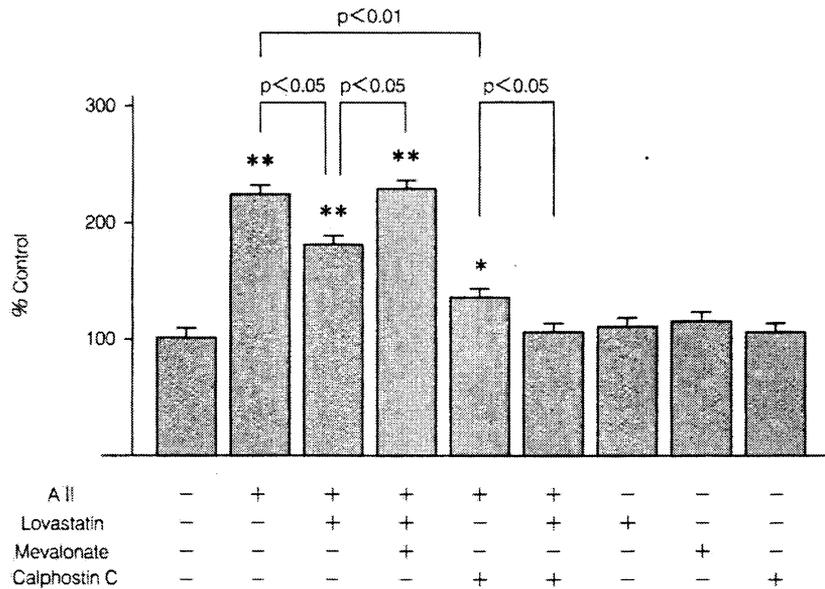


図 2. AII 刺激, lovastatin および calphostin C の MAP キナーゼ活性に及ぼす効果
 数値は 8dish の平均±標準誤差。*p<0.05, **p<0.01 v. s. 対照群。

RNA/DNA 比は培養 5 日目に 26% いずれも有意に増加した(図 1)。Lovastatin は AII 刺激による蛋白/DNA 比, RNA/DNA 比の増加をそれぞれ 38%, 52% 部分的に有意に抑制した(表 1)。Lovastatin によるこれらの抑制効果は mevalonate を同時に前処置すると消失した(表 1)。

2) AII および lovastatin の蛋白合成速度に及ぼす効果

AII 刺激により蛋白合成速度は 17% 有意に亢進した(表 1)。Lovastatin は AII 刺激による蛋白合成速度の亢進を 45% 有意に抑制し, この抑制効果は mevalonate を同時に前処置すると消失した(表 1)。

3) Calphostin C の RNA 含量, 蛋白含量 および蛋白合成速度に及ぼす効果

Calphostin C は AII 刺激による蛋白/DNA 比, RNA/DNA 比, 蛋白合成速度の増加をそれぞれ 70%, 69%, 73% 部分的に有意に抑制した(表 2)。

さらに lovastatin と calphostin C の両者を前処置すると, AII 刺激による蛋白/DNA 比, RNA/DNA 比の増加および蛋白合成速度の増加は完全に抑制された(表 2)。

4) AII, lovastatin および calphostin C の MAP キナーゼ活性に及ぼす効果

MAP キナーゼ活性は, AII 刺激 8 分後で投与前値の約 2.1 倍に有意に上昇した。Lovastatin は, AII 刺激による MAP キナーゼ活性の上昇を 32% 有意に抑制し, この抑制効果は mevalonate を同時に前処置すると消失した(表 2)。Calphostin C は AII 刺激による MAP キナーゼ活性の上昇を 73% 有意に抑制し, さらに lovastatin と calphostin C の両者を前処置すると, AII 刺激による MAP キナーゼ活性の増加は完全に抑制された(図 2)。

5) AII 刺激および lovastatin の Ras 蛋白質活性に及ぼす効果

Ras 蛋白質活性は AII 刺激後 10 分で約 2.8 倍

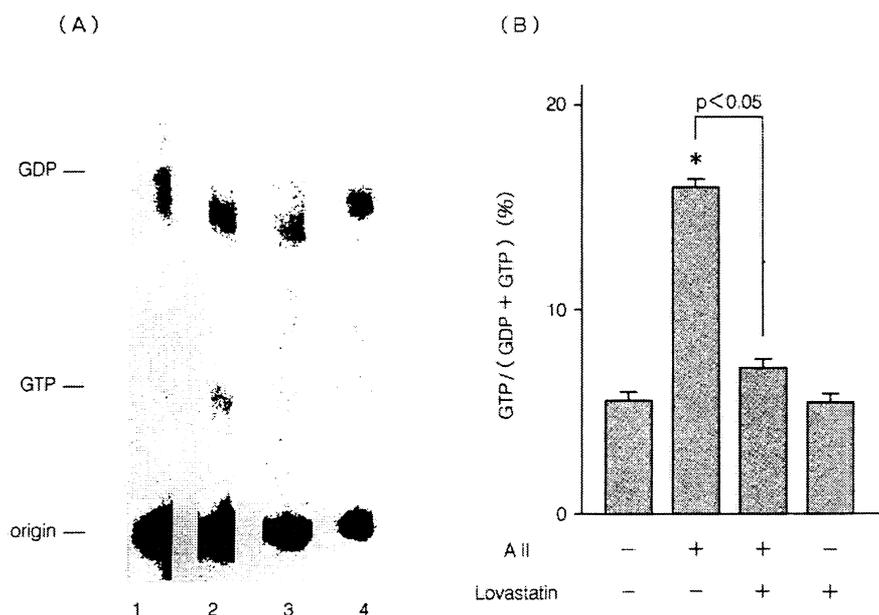


図 3. AII 刺激による Ras 蛋白質活性に対する lovastatin の効果
 (A) line 1: 対照群, line 2: AII 刺激群, line 3: lovastatin 前処置 AII 刺激群, line 4: lovastatin 前処置群. (B) 数値は 8dish の平均±標準誤差.
 * $p < 0.05$ v. s. 対照群.

に有意に増加し, lovastatin はこの Ras 蛋白質活性の増加を 81% 有意に抑制した (図 3)。

3 考 察

AII は, AT_1 受容体刺激により PKC 活性, MAP キナーゼ活性, mRNA 発現などを介して心肥大を形成することが知られている。本研究においても, 新生児ラット培養心筋細胞において AII 刺激は MAP キナーゼ活性を, ついで蛋白合成速度を亢進し, RNA および蛋白含量を増加させ, AII によるこれらの増加は選択的 PKC 阻害薬 calphostin C により部分的に有意に抑制された。これらの結果より, AII 刺激による心肥大形成には PKC 依存性の経路が関与していることが明らかである。

一方, 最近, AII 刺激により Ras が活性化され, ついで PKC 非依存性に MAP キナーゼ活性を亢進させる Ras/MAP キナーゼ系が心肥大に関与している可能性があるとする報告がある⁴⁾。この

Ras 蛋白は細胞膜への局在化, すなわち farnesylation によりはじめて活性型となる。この farnesylation には mevalonate 代謝により産生される farnesyl pyrophosphate が必須であり, mevalonate を合成する HMG-CoA 還元酵素はこの代謝の中心となる重要な酵素である。それ故, HMG-CoA 還元酵素阻害薬は mevalonate の細胞内合成を抑制することにより farnesylation を阻害し, 細胞機能に影響を与える可能性がある⁵⁾。

そこで, 本研究では心筋細胞において HMG-CoA 還元酵素阻害薬が AII による心肥大形成を抑制するか否か, もしそうならば Ras/MAP キナーゼ系が介する作用なのか否かを解明するために, HMG-CoA 還元酵素阻害薬 lovastatin の AII 刺激による MAP キナーゼ活性, Ras の活性化, 蛋白合成速度, RNA および蛋白含量に及ぼす効果について検討した。その結果, lovastatin は AII 刺激時の蛋白合成速度の亢進, RNA および蛋白含量の増加を部分的に有意に抑制し, これらの抑

制効果は mevalonate 投与により消失した。一方、calphostin C も AII によるこれらの増加を部分的に有意に抑制し、lovastatin と calphostin C の併用投与は完全に有意に抑制した。lovastatin および calphostin C は AII 刺激による MAP キナーゼ活性の亢進を部分的に有意に抑制し、両者の併用投与はその亢進を完全に抑制した。さらに、lovastatin は AII 刺激による Ras 蛋白質活性の亢進を有意に抑制した。これらの結果は、lovastatin は mevalonate 代謝に関連する Ras/MAP キナーゼ系を介して AII 刺激による心肥大形成を抑制すること、さらに AII 刺激時の心肥大形成には PKC を介する MAP キナーゼ系に加え Ras を介する MAP キナーゼ系が協調的に作用していることを示唆している。

●おわりに

無血清培養の心筋細胞において、

- 1) AII 刺激は蛋白合成速度を亢進させ、RNA/DNA 比、蛋白/DNA 比を増加させた。
 - 2) Lovastatin の前処置は AII 刺激によるこれらの増加を部分的に抑制し、この抑制効果は mevalonate を同時に前処理すると消失した。
 - 3) Lovastatin または calphostin C の単独投与では AII 刺激による MAP キナーゼ活性の亢進をそれぞれ部分的に抑制し、両者の併用は完全に抑制した。
 - 4) AII 刺激は Ras 蛋白質活性を亢進させ、lovastatin はこの亢進を抑制した。
- 以上より、HMG-CoA 還元酵素阻害薬 lovastatin は Ras/MAP キナーゼ系を介して AII 刺激

時の心肥大形成を部分的に抑制すること、さらにこの AII 刺激時の心肥大形成には PKC/MAP キナーゼ系に加え Ras/MAP キナーゼ系が協調して関与していることが明示された。



文 献

- 1) Miyata S, Haneda T.: Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by type 1 angiotensin II receptor. *Am J Physiol*, **266**: 2443-2451, 1994
- 2) Gibbs JB: Ras C-terminal processing enzymes-new drug targets?. *Cell*, **65**: 1-4, 1991
- 3) O'Donnell MP, Kasiske BL, Kim Y, Atluru D, Keane WF: Lovastatin inhibits proliferation of rat mesangial cells. *J Clin Invest*, **91**: 83-87, 1993
- 4) Sadoshima J, Izumo S: The heterotrimeric Gq protein-coupled angiotensin II receptor activates p21ras via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway in cardiac myocytes. *EMBO J*, **15**: 775-787, 1996
- 5) Maltese WA: Post-translational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J*, **4**: 3319-3328, 1990
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A L *et al*: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275, 1951
- 7) Munro HN, Fleck A: The determination of nucleic acids. In: *Methods of biochemical analysis*, vol. 14. by Glick, D., Wiley, New York, 1966, pp. 113-176
- 8) Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L: Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. *Anal. Biochem.* **100**: 188-197, 1979